Einfluß der Linolsäurezufuhr auf die renale Prostaglandinsynthese

Wolfgang Grundl

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544313_0006

Aus der Medizinischen Poliklinik
der Universität München

(Direktor Prof.Dr. Nepomuk Zöllner)

Einfluß der Linolsäurezufuhr auf die renale Prostaglandinsynthese

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Grundl

aus

München

1984

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Wolfram
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. N. Zöllner
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 2. August 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Methodik	4
3. Ergebnisse	11
4. Diskussion	14
5. Zusammenfassung	19
Anhang	20
1. Abbildungen	21
2. Tabellen	33
Literaturverzeichnis	43

A. Einleitung

Prostaglandine sind eine Gruppe chemisch verwandter, zyklischer, mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Im menschlichen Körper kommen sie ubiquitär vor. Ihre Rolle im Stoffwechsel ist weithin ungeklärt, wiewohl zahlreiche Wirkungen in vitro wie im Tierversuch experimentell untersucht und beschrieben wurden.

Die Nierenfunktion soll durch Prostaglandine in mehrfacher Hinsicht beeinflußt werden. Prostaglandine modulieren die Vasokonstriktion infolge der Wirkung von Angiotensins II als auch die Ischämien infolge anderer Ursachen. Durch Blockade der Prostaglandinsynthese bei bestehendem erhöhtem Sympathicus-Tonus oder nach Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems ist eine Abnahme renaler Perfusion und damit der gesamten Nierenfunktion festzustellen. Im Ruhezustand des betreffenden Systems sind diese Wirkungen der Prostaglandinsynthesehemmer nicht meßbar (1).

Die Reninfreisetzung selbst steht dabei, so wird vermutet, unter modulierender Kontrolle von Seiten der Prostaglandine (9). Die Möglichkeit einer Prostaglandinsynthese in den Zellen des juxtaglomerularen Apparates wird hingegen ausgeschlossen (2).

Auch der cAMP-vermittelte Effekt des Vasopressins (Adiuretins) wird durch Prostaglandine beeinflußt, meist im Sinne eines Antagonismus. Hierdurch kann die Konzentration des ausgeschiedenen Urins verändert werden (1, 2). Darüber hinaus kontrollieren die Prostaglandine auch tubuläre Faktoren, denen ein Einfluß auf die Reabsorption von Wasser beizumessen ist (1).

Des weiteren scheinen die Prostaglandine in den Prozeß des NaCl-Transports einzugreifen. Dies ist auf hormonaler Ebene durch die Wirkungen im Renin-Angiotensin-Aldosteron- und Vasopressinsystem, aber auch durch eine direkte Wirkung auf die tubuläre Funktion möglich (1).

Den Prostaglandinen wird auch für die Pathogenese der Hypertonie eine Bedeutung zugeschrieben. Die vaskuläre wie renale Prostaglandinsynthese scheint bei allen Hypertonieformen verändert zu sein (3).

Den Prostglandinen kommt aufgrund dieser meist in vitro oder im Tierversuch festgestellten Effekte wahrscheinlich eine Rolle in der Regulation des Gefäßwiderstandes sowie des NaCl- und Wassertransportes zu. Dabei scheinen die Prostaglandinwirkungen im physiologischen Zustand um ein Vielfaches geringer zu sein als unter pathologischen Bedingungen.

Die einzelnen Prostaglandine unterscheiden sich durch die unterschiedliche Anordnung hinter Doppelbindungen sowie der Hydroxyl- und Ketogruppen. Man teilt sie in vier Hauptgruppen A, B, E und F ein. Es gibt sechs E- und F-Verbindungen, die sich von dihomogamma-Linolensäure, Eicosa-, tetra- und penta-en -Säuren (Fettsäuren mit 2o Kohlenstoffatomen und drei bzw. vier oder fünf Doppelbindungen) herleiten. Prostaglandine des E-Typs (PG E) unterscheiden sich von denen des F-Typs dadurch, daß sie am Kohlenstoffatom C-9 eine Keto- statt einer Hydroxylgruppe aufweisen (4). Der Index α oder β deutet auf die stereochemische Lage neben dieser Hydroxylgruppe. Gemeinsam ist all diesen sowie den meisten anderen Prostaglandinen eine L-Hydroxylgruppe in C-15 und eine Δ-13-Trans-Doppelbindung (4). Die Prostaglandin-Klasse 1 weist nur diese eine Doppelbindung auf, die Klasse 2 besitzt zusätzlich eine Δ-5-Cis-, die Klasse 3 darüber hinaus eine Δ-17-Cis-Doppelbindung (4). PG E_1,

PG E_2, PG E_3, PG $F_{1\alpha}$, PG $F_{2\alpha}$ und PG $F_{3\alpha}$ nennt man "primäre" Prostaglandine. Die "sekundären" Prostaglandine stellen im Gegensatz dazu dehydrierte Verbindungen und vermutlich Artefakte bei unsachgemäßer Lagerung dar (4). Sie entstehen durch Verlust der 11-α-Hydroxylgruppe der E-Reihe (4). Die acht sekundären Prostaglandine, die man in der menschlichen Samenflüssigkeit nachweisen kann, sind also PG A_1, PG A_2, PG B_1, PG B_2 und deren 19-Hydroxyl-Derivate. Auch beim Prostaglandin C handelt es sich um eine dehydrierte Verbindung mit einer Doppelbindung in der Δ-11-Position(4). Die Prostaglandine des D-Typs sind zu denen der E-Verbindungen isomer (Ketogruppe an C-11 und α-Hydroxylgruppe an C-9 (4) (Abbildung 1).

Die Prostaglandin-Biosynthese als ein Teilbereich des Lipid-Stoffwechsels ist als solche weitestgehend vom zugrundeliegenden alimentären Angebot abhängig. In der Nahrungsvielfalt des Menschen aus Proteinen, Kohlehydraten und Lipiden lassen sich essentielle von nichtessentiellen Stoffen abgrenzen, also solche, die der menschliche Organismus selbst synthetisieren kann und solche, auf deren Substitution er angewiesen ist. Präkursor-Substanzen der Prostaglandin-Biosynthese sind die essentiellen Fettsäuren Arachidon-, Linol- und Linolensäure (2). Die Inaktivierung lokal gebildeter Prostaglandine erfolgt wahrscheinlich während ihrer pulmonalen Passage. Im Urin sind dann die entsprechenden Abbauprodukte nachweisbar. Die im Urin erscheinenden nicht metabolisierten Prostaglandine hingegen sind renaler Genese (21). Nachdem vor zwei Jahren Nugteren e.al. den Einfluß diätetischer Linolsäurezufuhr auf die Prostaglandinsynthese der Ratte untersucht hatten (1o), sollte durch unsere Untersuchung der Einfluß der Linolsäurezufuhr auf die renale Prostaglandinsynthese des Menschen gemessen werden.

B. Methodik

1. Extraktion und säulenchromatographische Trennung der im Urin enthaltenen Prostaglandine

Im Urin befinden sich die Urinmetaboliten der im Körper gebildeten Prostaglandine. Die von der Niere stammenden Prostaglandine werden zum Teil unverändert ausgeschieden. Die Menge dieser nativen Prostaglandine ist im Vergleich zu den Prostaglandinabbauprodukten gering. Mit radio-immunologischen Methoden können einige dieser Metaboliten aber die Bestimmungen stören, indem sie ebenfalls mit dem Antikörper reagieren, wie auch unspezifische Kreuzreaktionen mit im Urin vorhandenen Substanzen bekannt sind.

Um die Menge renal ausgeschiedener Prostaglandine radioimmunologisch bestimmen zu können, ist es deshalb notwendig, sie von anderen, gleichfalls im Urin enthaltenen Substanzen zu isolieren und darüber hinaus die einzelnen Prostaglandine voneinander zu trennen.

1.1. Prinzip der Extraktion und Trennung der Prostaglandine aus dem Urin

Prostaglandine als Lipide lassen sich aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften von anderen im Urin enthaltenen Substanzen weitgehend isolieren. Das Verfahren zur Extraktion basiert auf den unterschiedlichen Eigenschaften lipophiler und hydrophiler Lösungsmittel (1). Ebenso ist es möglich, den unterschiedlichen Gehalt an OH-Gruppen, durch den sich die Prostaglandine voneinander unterscheiden, zu ihrer chromatographischen Trennung auszunutzen.

1.1.1. Extraktion der Prostaglandine aus dem Urin

Frischer Urin wurde am Ende der jeweiligen Sammelperiode - also spätestens nach 24 Stunden - bei -18° C eingefroren. Zur Analyse wurde der gefrorene Urin bei Zimmertemperatur im Wasserbad aufgetaut, kurz aufgeschüttelt, bei etwa 10 ml in Reagenzgläser abgefüllt und bei 4° C für 10 Minuten bei 2500 $Umin^{-1}$ zentrifugiert.

Anschließend wurden je Probe 2 ml abpipettiert, pro Arbeitsgang 4 - 8 Proben analysiert. Die Extraktion erfolgte durch Zugabe von je 10 ml einer Ethylacetat-Isopropanol-0,1 n-HCl-Lösung (3 : 3 : 1/ Ethylacetat : Isopropanol : 0,1 n-HCl). Mit einer automatischen Schüttelvorrichtung wurde 7 Minuten bei Raumtemperatur bei einem pH von annähernd 3 extrahiert. Der so vorbereiteten Mischung wurden nacheinander 10 ml 0,9%ige NaCl-Lösung sowie 6 ml Ethylacetat hinzugefügt und nach nochmaligem kurzem Aufschütteln die Phasentrennung abgewartet. Die obere Ethylacetat-Phase wurde vorsichtig abpipettiert und im Wasserbad bei 40° C unter leichtem Stickstoff-Strom zum Trocknen gebracht.

1.1.1.1. Verwendete Reagenzien

Isopropanol und Ethylacetat wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Die Tritium-markierten Prostaglandine (5, 6, 8, 11, 12, 14, 15 (n)-^{3}H)-PG E_2, Code TRK 431, Batch 32, sowie (5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15 (n)-^{3}H)-PG $F_{2\alpha}$, Code TRK 464, Batch 30, stammten von Amersham Buchler GmbH & Co.KG, D-3300 Braunschweig.

1.1.1.2. Bestimmung der Ausbeute bei der Extraktion

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden zu je 2 ml der Urinproben 1oo µl einer Lösung von Tritium-markiertem PG E_2 oder PG $F_{2\alpha}$ in Phosphatpuffer entsprechend ca. 1ooo cpm gegeben. Zur Vermeidung von Interferenzen erfolgte also die Wiedergewinnungskontrolle für die PG E_2 und $F_{2\alpha}$ in getrennten Arbeitsgängen.

1.1.2. Säulenchromatographische Trennung

1,o g Kieselgel wurde nach dem Abwiegen in kleine Bechergläser gegeben und 8o Minuten lang bei 18o° C im Trockenschrank aktiviert. Nach Abkühlung erfolgte die Aufnahme in 6 ml der Suspension S1. Dieses Gemisch wurde in Glassäulen mit einem Durchmesser von o,9 cm gegeben, die am unteren Ende einen Quarzwollefilter hatten. Die Säulenhöhe betrug ca. 6 cm. Sie wurde vor dem Auftragen des Extrakts zunächst mit 9 ml der Suspension S2 sowie schließlich mit 2 + 1 ml der Suspension S1 nachgewaschen. Erst jetzt wurde der Extrakt nach Aufnahme in o,2 ml der Suspension S3 und o,6 ml der Suspension S1 nach sorgfältigem Schütteln auf die Säule gebracht. Während des gesamten Arbeitsganges wurde darauf geachtet, ein Eintrocknen der Kieselgel-Säule zu vermeiden.

1.1.2.1. Elution der Prostaglandine

Durch die präparierte Säule wurden zunächst 15 ml der Lösung S1 gegeben. Das Eluat, welches PG A und B enthielt, wurde verworfen. Die nächste Stufengradientenelution, mit 22 ml der Suspension S4,enthielt PG E und wurde bei 4o° C im Wasserbad unter leichtem Stickstoff-Strom zum Trocknen gebracht. Abschließend wurde dann mit 9 ml der Suspension S2 eluiert. Diese Fraktion enthielt PG F und wurde ebenso unter Stickstoff zur Trockne gebracht.

1.1.2.2. Vorbereitung zur radioimmunologischen Bestimmung

Die letzten beiden Fraktionen, welche PG E und PG F enthalten, wurden nach Abschluß des Trocknungsvorgangs in o,3 ml Gelphos gelöst.

1.1.2.3. Bestimmung der Ausbeute

Je ein Aliquot (5o µl) der erhaltenen Lösungen wurde in ein Szintillationsgefäß gegeben und zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der zugegebenen Trägersubstanz im Szintillationszähler gemessen. Der gefundene Wert wurde entsprechend dem Probenvolumen (3oo : 5o µl) korrigiert und aus dem Quotienten (wiedergefundene Menge Tritium-markiertes Prostaglandin : eingesetzte Menge) die Ausbeute berechnet.

1.1.2.4. Bestimmung der Trennschärfe der Säulenchromatographie

Das Elutionsprofil der Prostaglandine A, B, E und F wurde nach demselben Verfahren bestimmt, wie es zur späteren Fraktionierung der Urin-Prostaglandine verwendet wurde (siehe 1.1.2.1.). Die Menge der einzelnen Fraktionen war 2 ml. Die Szintillationsgefäße wurden also nicht nur am Ende jedes Stufengradienten gewechselt. So konnte eine exaktere Unterteilung der Zeit-Achse erreicht werden. Um meßbare Zählraten in den Fraktionen zu bekommen, wurden 10^4 cpm der einzelnen Prostaglandine zugegeben (etwa die zehnfache Menge an markierter Trägersubstanz im Vergleich zur späteren Bestimmung der Ausbeute). Die Elutionsprofile für PG E und PG F wurden in voneinander unabhängigen Arbeitsgängen erstellt.

1.1.2.5. Verwendete Reagenzien

Von Sigma-Chemicol Company stammte das Kieselgel (SiO_2). Ethylacetat, Benzol und Methanol der Firma Merck setzten sich in den einzelnen Elutions-Lösungen wie folgt zusammen: Die Suspension S1 enthielt Ethylacetat und Benzol im Mischungsverhältnis von 6o : 4o. Des weiteren wurden den Suspensionen S2, S3 und S4 2o, 1o bzw. 2 Volumenanteile Methanol zugesetzt (Tabelle 1).

1.1.2.6. Radioimmunologische Bestimmung

Die Prostaglandine wurden radioimmunologisch gemessen. Dabei handelt es sich um eine spezielle Form des allgemeinen Prinzips der kompetitiven Proteinbindungsanalyse. Das dieser Methode zugrundeliegende Reaktionsprinzip beruht auf der Kombination eines Antigens mit einem spezifischen Antikörper zu einem Antigen-Antikörper-Komplex. Fügte man also einer Prostaglandin (Antigen)-enthaltenden Probe (Standard oder Probe) eine definierte Menge Tritium-markiertes Prostaglandin zu, dann konkurrieren markiertes und nicht-markiertes Antigen um eine begrenzte Anzahl freier Bindungsplätze am Antikörper. Im Assay hält man die Konzentrationen von Antikörper und markiertem Prostaglandin konstant, während die Menge zu analysierenden Prostaglandins den variablen Parameter darstellt. Eine zunehmende Konzentration von Prostaglandin in der Probe führt zu einer Abnahme des Antikörper-gebundenen markierten Prostaglandins. Die analog zunehmenden Mengen freien Prostaglandins werden durch Dextran-Aktivkohle abgefangen. Mit Hilfe definierter Standard-Prostaglandin-Konzentrationen werden Eichkurven erstellt, bei denen auf der Abszisse die Konzentrationen des nicht-markierten, auf der Ordinate die Zählrate des Antikörper-gebundenen markierten Prostaglandins aufgetragen werden

Die gemessenen Zählraten radioaktiv markierten Tracers erlauben es, die zu bestimmende Prostaglandin-Konzentrationen der Proben aus der Eichkurve abzulesen.

2. Formeldiät

Zwei isocalorische Formeldiäten wurden im Cross-over-Versuch über jeweils drei Wochen gegeben. Formeldiät 1 enthielt 15 % der Nahrungsenergie als Eiweiß und 85 % als Kohlenhydrate. In Formeldiät 2 wurden 3o % der Nahrungsenergie als Fett gegeben, der Kohlenhydratanteil wurde auf 55 % reduziert, während der Eiweißanteil gleich blieb. Der Fettanteil enthielt 2o Energieprozent Linolsäure pro 22oo kcal. Die Zusammensetzung der Eiweiß-, Fett- und Kohlenhydratanteile der Formeldiät ist in den Tabellen 2 und 3 angegeben.

3. Versuchsdurchführung

Sieben Tage vor Versuchsbeginn führten die Versuchspersonen ein Ernährungsprotokoll,aus dem der tägliche Energiebedarf und die tägliche Linolsäurezufuhr berechnet wurden. Bereits zu dieser Zeit begannen sie den 24-Stunden-Urin zu sammeln. Dann erhielten sie die isocalorischen Formeldiäten über 42 Tage. Versuchspersonen ABC erhielten in den ersten drei Wochen die Formeldiät mit einem Linolsäuregehalt von 2o % der Nahrungsenergie, während Versuchspersonen DEF mit der linolsäure- und fettfreien Formeldiät begannen. Nach drei Wochen wurden die Formeldiäten gewechselt. Während der gesamten Versuchsdauer wurde der 24-Stunden-Urin für die Bestimmung der PG E und F gesammelt. Am Morgen eines jeden Tages wurde die Menge in den 24 Stunden bestimmt und ein Aliquot von loo ml für die späteren Bestimmungen bei -2o° gelagert.

Die Proben zu Beginn und am Ende des Versuchs sowie die Werte bei Wechsel der Formeldiäten wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Von jeder säulenchromatographisch getrennten Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Somit wurde von jedem dieser Werte eine sechsfache Bestimmung erzielt.

4. Versuchspersonen

Am Versuch nahmen sechs klinisch und laborchemisch gesunde Frauen im Alter zwischen 22 und 31 Jahren teil, welche über den Versuchsablauf und die Problemstellung informiert waren. Die Beschreibung der Versuchspersonen zeigt Tabelle 4.

C. Ergebnisse

1. Ergebnisse der Trennschärfebestimmung der Säulenchromatographie

Kieselgel der Firma Merck erbrachte in keinem Fall befriedigende Trennungsprofile. Bereits nach Elution mit 15 ml der Mischung S1 waren über 6o % sowohl des Tritium-markierten PG E wie des PG F in der Fraktion nachzuweisen. Dagegen waren in den durch Elution mit S4 bzw. S2 erhaltenen Fraktionen nur jeweils unter 5 % der erwarteten Prostaglandinmenge enthalten. Erst mit dem Wechsel auf Kieselsäure von Sigma ließen sich zufriedenstellende Trennungsmuster erzielen. So fanden sich bei bloßer Auftragung markierter Prostaglandin-Tracer-Substanzen auf die Säule - also ohne vorhergehende Urinextraktion - jeweils über 7o % der eluierten Prostaglandine in den erwarteten Fraktionen. Nach Vorschalten der Urinextraktion - nach Zusatz markierter Prostaglandine - ergab sich, bei einer extrahierten Urinmenge von 3 ml, eine weitaus weniger scharfe Trennung. Die Reduktion der ursprünglich eingesetzten Urinmenge auf 2 ml erbrachte schließlich wieder das gewünschte scharfe Trennungsprofil (Abbildung 2 und 3, Tabelle 5 und 6).

Die Wiederfindungsrate der vor Beginn des Elutions- und Trennungsprozesses zugesetzten Tracersubstanzen lag während aller Analysevorgänge für PG E_2 jeweils zwischen 2o und 5o % sowie für PG $F_{2\alpha}$ zwischen 2o und 6o %.

2. Ergebnisse des Formeldiät-Versuches

Es fand sich kein Hinweis auf eine zeitabhängige Änderung der PG E oder F-Ausscheidung während des sechswöchigen Formeldiät-Versuches. Die gemessenen Werte waren bei der Versuchsgruppe 1 (Versuchspersonen ABC) und der Versuchsgruppe

2 (Versuchspersonen DEF) unter den entsprechenden Formeldiäten etwa in demselben Bereich, unabhängig von der zeitlichen Reihenfolge.

Unter freier Kost, vor Beginn der Formeldiäternährung, fanden wir bei den Versuchspersonen A - F Werte für die PG E-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin, welche in dem Normalbereich liegen, der in der Literatur angegeben wird (11). Die Gruppe A, B, C zeigte unter dem Einfluß der zuerst gegebenen Formeldiät 2, welche 5o g/die Linolsäure enthielt, einen Anstieg der Prostaglandinausscheidung bis auf das Dreifache der unter freier Kost gemessenen Werte. Nach Umstellen auf die linolsäurefreie Formeldiät 1 war die PG E-Ausscheidung wieder im Bereich der Vorversuchswerte (Abbildung 4, Tabelle 9). Die Vergleichsgruppe D, E, F läßt durch die Umstellung von nicht vorgeschriebener Ernährung auf die Formeldiät 1 keine Veränderung der PG E-Ausscheidung erkennen. Nach Gabe der Formeldiät 2 jedoch ergibt sich auch hier ein deutlicher Anstieg der Werte bis auf 375 ng/die (Abbildung 5, Tabelle 9). Die Prostaglandin-E-Werte der Versuchspersonen A und C zeigen dabei den gleichen Verlauf, der sich für die Durchschnittswerte beschreiben läßt. Bei Versuchsperson B beobachtet man keinen deutlichen Anstieg der Werte beim Übergang von frei gewählter Kost auf die Formeldiät 2 (Abbildung 6, Tabelle 7). Die für die drei Versuchspersonen D, E, F der Gruppe 2 erhaltenen Werte bestätigen im einzelnen die beschriebene Tendenz der Durchschnittswerte, die dabei aber bei Versuchsperson D am deutlichsten ausgeprägt erscheint. Von 144 ng/die vor Versuchsbeginn steigen die Werte bis über 58o ng/die am letzten Tag des Versuches an. Die Versuchspersonen E und F zeigen ein Ansteigen der Ausgangswerte von 12o ng/die auf Höchstwerte von 44o bzw. 35o ng/die (Abbildung 7, Tabelle 7).

Für die PG F-Ausscheidung fanden sich unter freier Kost bei unseren Versuchspersonen niedrigere Werte als von den meisten Untersuchungen beschrieben wurden. Die im 24-Stunden-Urin der einzelnen Versuchspersonen gemessenen Werte streuten mehr als dies bei den PG E-Werten der Fall war. Die gerichteten Veränderungen sind deswegen auch weniger deutlich ausgeprägt. Die Gruppe A, B, C zeigt unter dem Einfluß der Formeldiät 2 einen Anstieg von 248 am Tage vor Versuchsbeginn bis auf über 64o ng/die (Abbildung 8, Tabelle 1o). Am Ende der linolsäurefreien Perioden lagen die Werte für alle Prostaglandinausscheidungen im 24-Stunden-Urin wieder bei 4oo ng/die und damit nur wenig über den Werten, die vor Versuchsbeginn unter freier Kost gemessen worden waren. Auch bei den Versuchspersonen D, E, F fällt unter konstanter Linolsäurezufuhr ein Ansteigen der Druckschnittweite von 338 zu Beginn der Messungen bis auf 72o ng/die auf. Die während freier Kost gemessenen Werte unterscheiden sich hingegen nicht von denen vor Versuchsbeginn (Abbildung 9, Tabelle 1o).

Abweichungen von diesen Mittelwerten zeigen die Versuchspersonen A und F. Unter dem Einfluß beider Formeldiäten lagen die Werte zwischen 465 und 486 ng/die für die Versuchsperson A sowie zwischen 427 und 547 ng/die bei F, sodaß sich kein Effekt der Linolsäure erkennen läßt (Abbildungen 1o und 11, Tabelle 8).

D. Diskussion

Unter Zufuhr von Linolsäure beobachteten wir ein Ansteigen sowohl der PG E als auch der PG F-Menge im 24-Stunden-Urin, wobei die Beeinflussung der PG F-Werte durch Linolsäurezufuhr jedoch weniger ausgeprägt war.

Die in der Literatur beschriebene Überlegenheit des Kieselgels der Firma Sigma (12) bestätigte sich auch in unserem Versuch bei der säulenchromatographischen Trennung. Die Verwendung anderer Sorten Kieselgel ergab keine befriedigenden Trennschärfen. Die Reduktion der entsprechend der Originalvorschrift einzusetzenden Urinmenge (13) von 3 ml auf 2 ml war erforderlich, um die Bindungskapazität des Kieselgels nicht zu überschreiten. Mit dieser Verminderung wurde eine deutlich geringere Streuung bei den Wiederfindungsraten erreicht. Die trotzdem festgestellten Schwankungen der Trennschärfe dürften auf schwer kontrollierbare Einflüsse, z.B. bei der Aktivierung der Kieselsäulen sowie bei der Schichtung der Säulen zurückzuführen sein. Beide Faktoren haben Einfluß auf die Durchlaufgeschwindigkeit der Elutionslösungen und verändern so das Elutionsprofil. Die in unserem Versuch erzielten Trennschärfen waren nur wenig schlechter als von Kibbey et al. beschrieben (12).

Die Bestimmungen wurden an weiblichen Versuchspersonen durchgeführt, da bei Männern im Urin auch die im Genitaltrakt gebildeten Prostaglandine ausgeschieden werden. Dennoch ist die Möglichkeit von akzessorischen Prostaglandinbeimengungen aus Urethra und Blase nicht ausgeschlossen und muß als evtl. Störfaktor in Rechnung gestellt werden.

Die Prostaglandin-Biosynthese erfolgt aus mehrfach ungesättigten essentiellen Fettsäuren, welche eine Doppelbindung am 6. oder/und 3. Kohlenstoffatom von der CH_3-Gruppe ausge-

rechnet haben (ω-3,ω-6). Die Ausgangssubstanz für die Biosynthese der Prostaglandine der 2-Serie ist Arachidonsäure (2o : 4ω6), welche aus Linolsäure und Säugetierorganismus gebildet werden kann (15, 16). Aus der α-Linolensäure entsteht Eicosapentaensäure und aus letzterer Prostaglandin mit 3 Doppelbindungen in den Seitenketten (Abbildung 11). Über die sogenannte Prostaglandin-Kaskade werden Prostaglandine aufgebaut (2) (Abbildung 12). Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym ist eine Acylhydroxylase, meist Phospholipase A_2, welche die Prostaglandinvorläufer aus der β-Position der Phospholipide abspaltet (2). Der weitere Weg läuft dann über die Prostaglandin-Synthetase - einem Multienzym-Komplex mikrosomaler Lokalisation, bestehend aus Cyclooxygenasen, Isomerasen und Dehydratasen (17). Über ein weiteres Enzymsystem, die Lipoxygenase, entstehen Hydroxyfettsäuren und Leukotriene. Die Cyclooxygenase ist der Angriffspunkt für Acetylsalicylsäure sowie für die anderen nichtsteroidalen Antiphlogistica (18). Bei der Prostaglandin-Biosynthese werden auf diesem Weg mehrere Schritte durchlaufen. Verwandlung der Δ-11- in eine Δ-12-Doppelbindung durch eine Isomerase, Einbau eines molekularen Sauerstoffs an C-11, Ringschluß zum Cyclopentan-Ring und schließlich Einbau einer Hydroperoxyd-Gruppe an C-15. Der letzte Schritt führt dann zur Bildung des Prostaglandins G_2, das seinerseits über Abspaltung freier Radikale rasch zu Prostaglandin H_2 zerfällt. Beim PG H_2 handelt es sich um eine in wässrigem Medium instabile Intermediärsubstanz ($T_{1/2}$ 4-6 Minuten), die ihrerseits biologisch aktiv und Ausgangspunkt für die Entstehung weiterer biologisch aktiver Prostaglandine ist (18). Eine weitere Isomerase beschleunigt die Reaktion PG H_2 zu PG E_2. Die Thromboxan-Synthetase sowie die Prostacyclin- Synthetase führen zu den entsprechenden Endprodukten. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ entsteht vermutlich durch Vermittlung einer 9-Keto-Reduktase - eines cytoplasmatischen Enzyms - aus PG E_2 (19,2o); ein direkter Weg von PG H_2 zum PG F_2 kann aber nicht ausgeschlossen werden. (18).

Die Wirkung lokal gebildeter Prostaglandine ist zeitlich sehr kurz, da sie nach Abgabe in die Blutbahn und meist pulmonaler Metabolisierung sehr schnell inaktiviert werden (2). Fünf Stufen werden während dieser Inaktivierung durchlaufen: Dehydrierung der C-15-Hydroxygruppe, Absättigung der C-13-Doppelbindung, β-Oxydation, Reduktion der 9-Keto-Gruppe und Omega-Hydroxylierung (2, 18). Nach i.v.-Injektion markierter Prostaglandine E_2 und F_2 findet man im tierischen wie im menschlichen Urin diese Verbindungen wieder (21).

Diese Reaktionsfolge aber scheint Prostaglandine renaler Genese nicht oder nur zum Teil zu betreffen. Prostaglandine werden in der Niere nicht gespeichert (1). Ihre Freisetzung in den Extrazellulärraum darf deswegen als Maß ihrer renalen Synthese aufgefaßt werden (14). Die von der Niere selbst synthetisierten PG E_2 und PG $F_{2\alpha}$ dagegen können im Urin isoliert und nachgewiesen werden.

Zu Beginn unseres Versuches lagen die radioimmunologisch im 24-Stunden-Urin gemessenen Werte für PG E bei durchschnittlich 1o3.9 ng und für PG F bei 38o ng. Lijnen et al. gaben eine Tagesausscheidung von 84,9 $\pm$ 31,4 ng/die für PG E sowie 549,6 $\pm$ 122,5 ng/die für PG F an.

Die im 24-Stunden-Urin festgestellte PG E-Menge nahm von 114,4 ng/die für PG E unter linolsäurefreier Kost auf 2o8,7 ng/die unter Formeldiät 2, die PG F-Menge von 336,2 ng/die auf 5o4,8 ng/die zu. Durch Zufuhr des Substrates, Linolsäure, kann somit die renale Prostaglandinbildung gesteigert werden, wobei der Anstieg der PG E- viel deutlicher ausgeprägt ist als der der PG $F_{2\alpha}$-Produktion.

Unsere Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit vergleichbaren Veröffentlichungen von Nugteren et al.(11) und Adam et al. (5,6). Nugteren bei Ratten und Adam bei

weiblichen Versuchspersonen beschreiben einen Anstieg der Prostaglandin-Metaboliten im Urin durch vermehrte Linolsäurezufuhr mit der Nahrung. Diese Untersuchungen beschränkten sich nicht auf die renale Prostaglandinsynthese. Die gemessenen Werte sind deshalb wesentlich höher als bei unserem Versuch. Diesem Umstand mag es u.a. zuzuschreiben sein, daß wir keinen Unterschied beim Vergleich der PG E- und PG F-Tagesausscheidung während frei gewählter Kost und linolsäurefreier Formeldiät 1 finden konnten. Überdies erfolgte der Anstieg von PG E unter hoher Linolsäurezufuhr weniger rasch als bei dem von Adam et al. beschriebenen Versuchskollektiv (5)

Folgende Einflußmöglichkeiten auf die Prostaglandinsynthese sind im Hinblick auf unsere Ergebnisse darüber hinaus in Rechnung zu stellen. So ist noch weithin ungeklärt, welche Rolle dem Prostaglandin bei der Natriumaussscheidung zukommt. Die meisten Veröffentlichungen deuten darauf hin, daß ein chronisches NaCl-Defizit die PG E-Produktion und deren renale Ausscheidung erhöht. Auch zeigen Befunde in der Literatur, daß hohes Na-Angebot ein Absinken renaler PG E-Ausscheidung zur Folge hat (7). In unserem Versuch betrug die tägliche NaCl-Zufuhr 5 g/die, während die durchschnittliche Zufuhr mit freier Kost bei etwa lo g/die liegt. Auch ADH kann, zumindest in Säugetiernieren, die PG E_2-Produktion stimulieren (8). Befunde in der Literatur zeigen, daß die renale PG E-Ausscheidung mit dem Urinvolumen zunimmt. Diese Befunde wurden von Patienten mit Diabetes insipidus erhoben.

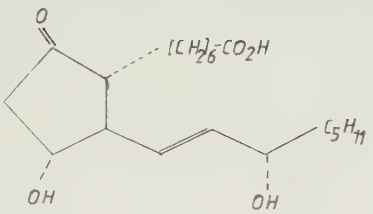
Andererseits scheinen Prostaglandine einen Einfluß auf die NaCl- und H_2O-Bilanz zu haben. Die Wirkungen der Prostaglandine auf die Natrium-Ausscheidung sind von mehreren Untersuchern beschrieben worden. Danach erhöhen PG E_2, D_2 und I_2 die renale Natrium-Ausscheidung in der gesunden Niere. Die-

ser natriuretische Effekt scheint dabei zum überwiegenden Teil durch hämodynamische Veränderungen vermittelt zu sein, über einen direkten Angriffspunkt v.a. des PG E_2 auf den Natrium-Transport in der Niere besteht noch Ungewißheit(14). So ist es auch zu verstehen, daß die Rolle derProstaglandine in der Pathogenese der verschiedenen Formen des Hypertonus zum Gegenstand vieler Untersuchungen geworden ist. Die renale PG E-Ausscheidung scheint bei Patienten mit essentieller Hypertonie erniedrigt zu sein (14). Renovaskulär bedingte Hochdruck-Formen weisen dagegen eine erhöhte renale Prostaglandin-Produktion auf. Möglicherweise wird hierdurch reaktiv die renale Durchblutung der ischämischen Niere aufrecht erhalten. In diese Richtung weisen auch andere Veröffentlichungen, die die Abhängigkeit renaler Perfusion von der begleitenden Prostaglandinbildung aufgezeigt haben.

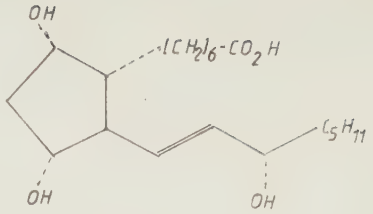
E. Zusammenfassung

Die renale Ausscheidung der Prostaglandine E_2 und $F_{2\alpha}$ wurde bei sechs gesunden Frauen während einer Linolsäurezufuhr von 0 g und 5o g pro Tag über jeweils drei Wochen Dauer mit Formeldiäten im Cross-over-Versuch gemessen. Die Bestimmung erfolgte mittels Radioimmuno-Assay nach säulenchromatographischer Auftrennung. Bei Linolsäurezufuhr von 5o g/die war ein Anstieg der PG E-Menge bis auf das Dreifache im 24-Stunden-Urin, verglichen mit den Werten unter linolsäurefreier Formeldiät oder freier Kost, festzustellen. Die Ergebnisse sprechen für einen Einfluß der Linolsäurezufuhr auf die renale PG E-Synthese, während die PG F-Bildung weniger deutlich beeinflußt wird.

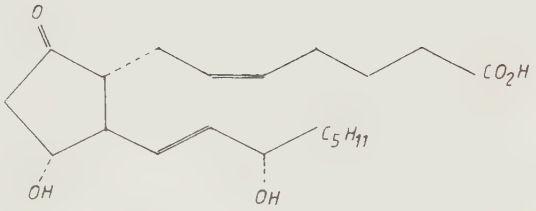
Anhang



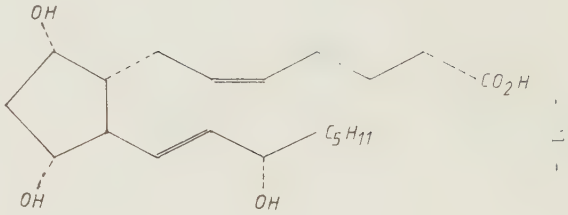
PGE_1



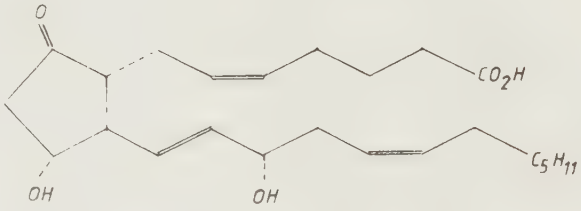
$PGF_{1\alpha}$



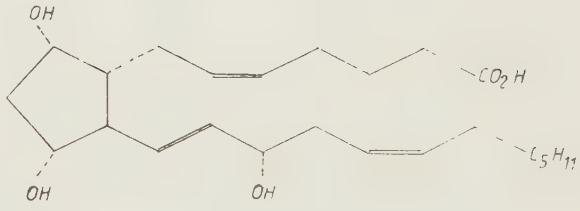
PGE_2



$PGF_{2\alpha}$



PGE_3



$PGF_{3\alpha}$

Abb 1 Die chemische Struktur der primären Prostaglandine

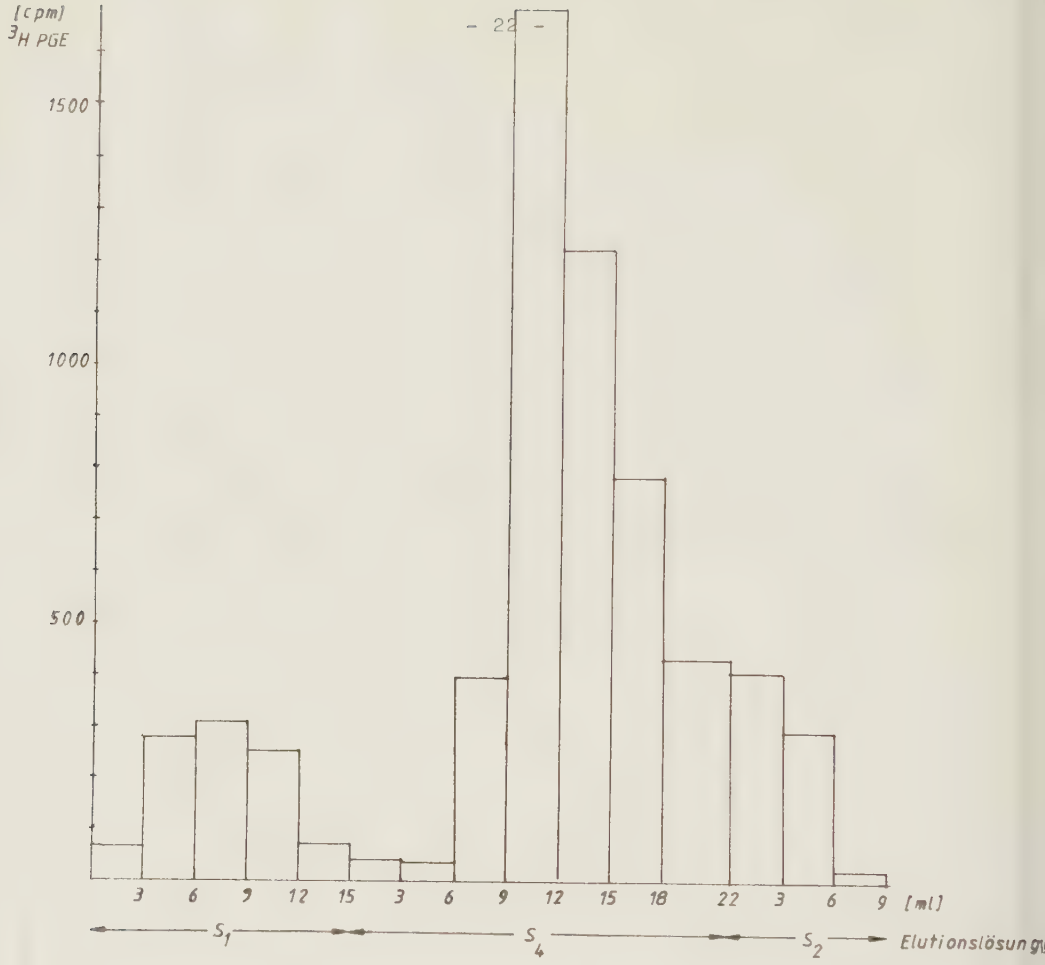


Abb 2 Elutionsprofil von (5,6,8,11,12,14,15(n)-^{3}H PGE$_2$ der säulenchromatographischen Trennung nach Extraktion aus 2ml Urin

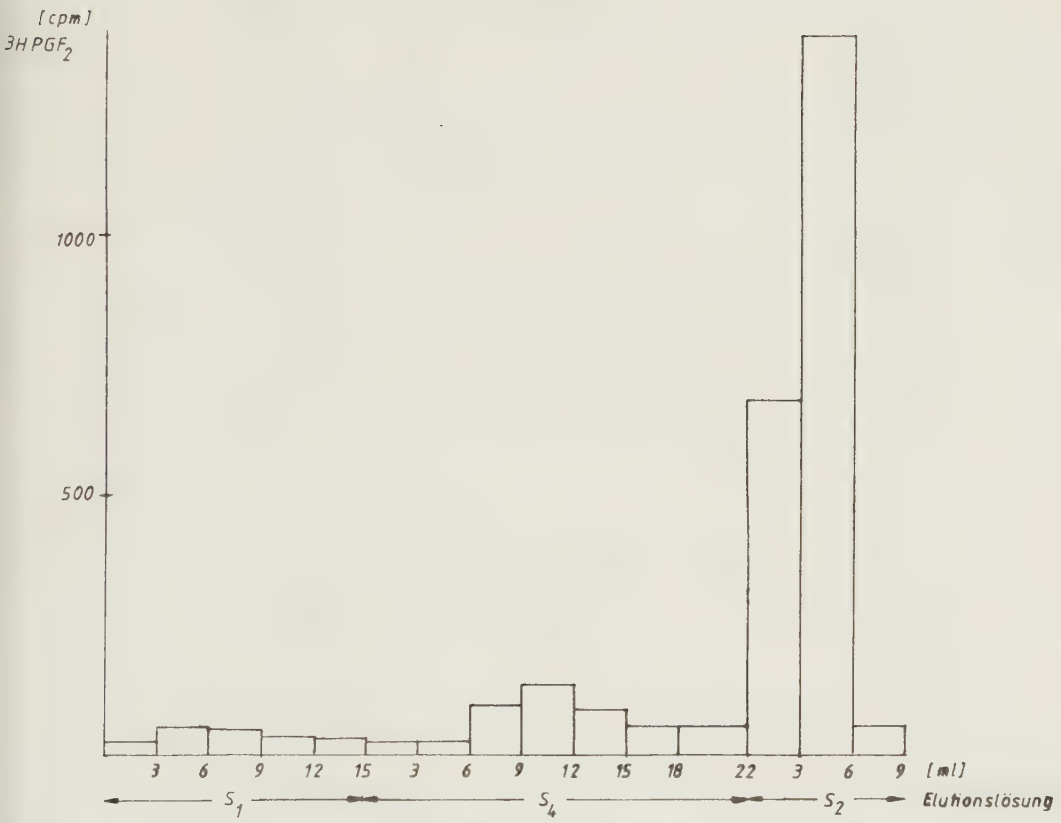


Abb 3 Elutionsprofil von [5 6 8 9 11 12 14 15(n)-^{3}H] PG $F_{2\alpha}$ der säulenchromatographischen Trennung nach Extraktion aus 2ml Urin

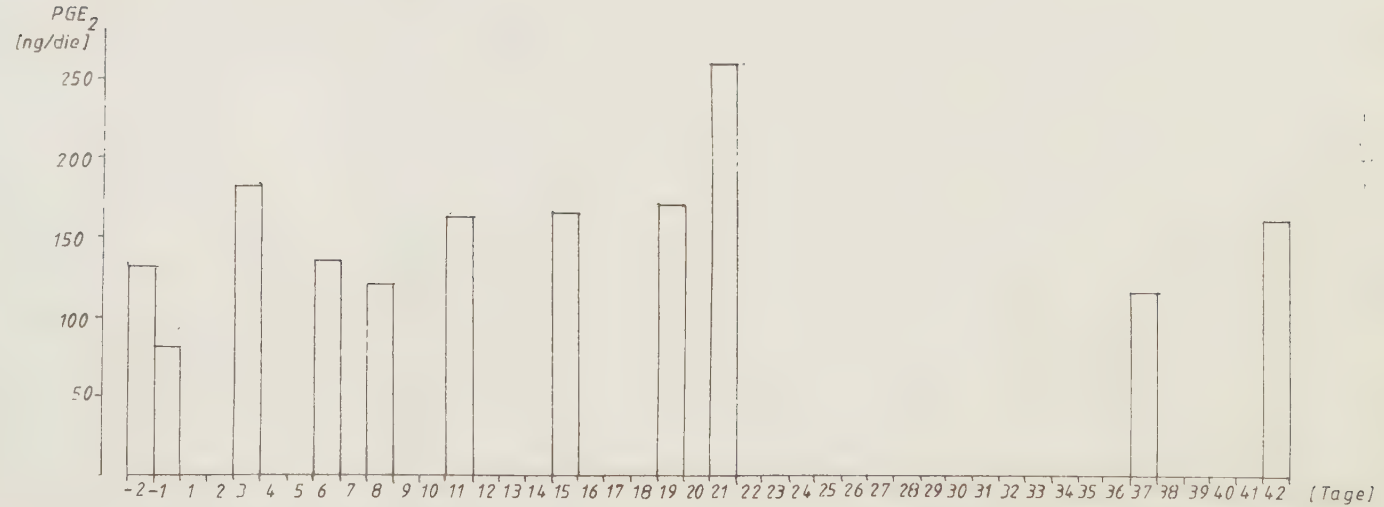


Abb 4 Durchschnittliche im 24 Std Urin der Versuchspersonen A B und C gemessene PG E_2- Ausscheidung während linolsaurereicher (Tag 1-21) und linolsäurefreier (Tag 22-42) Formeldiät-Ernährung

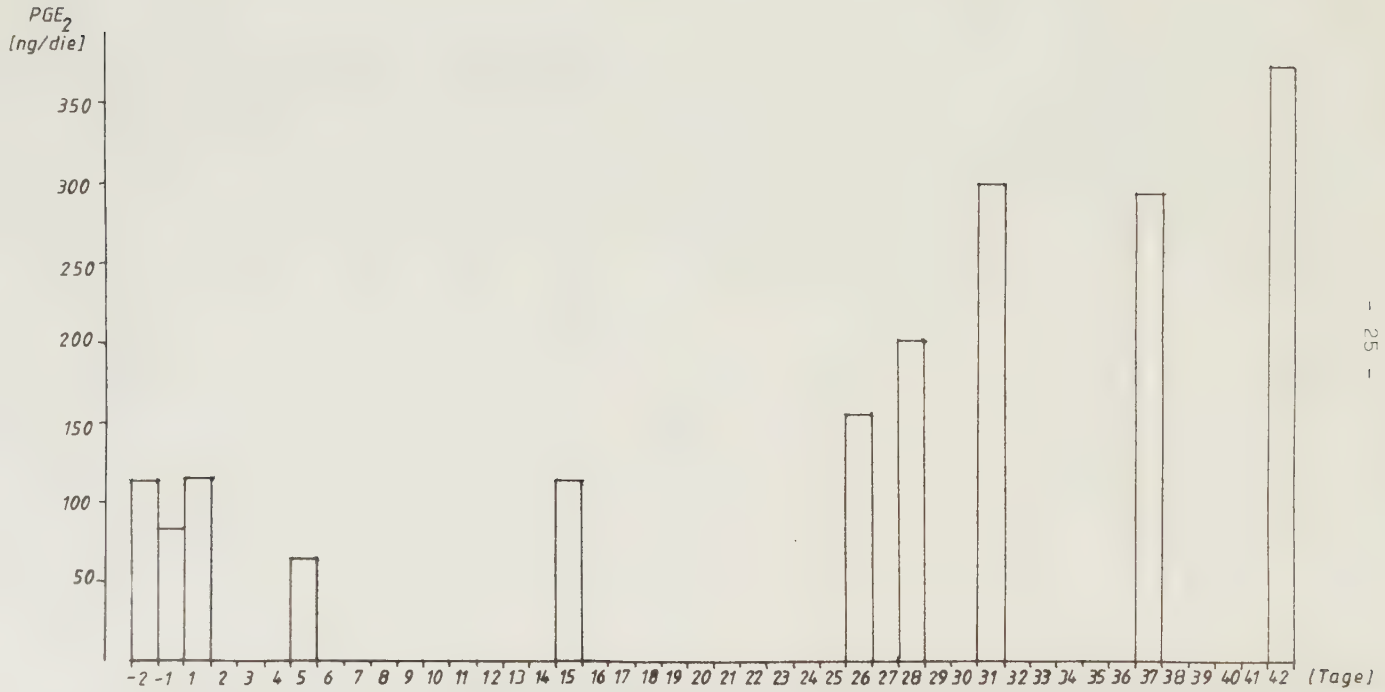


Abb 5 Durchschnittliche im 24 Std Urin der Versuchspersonen D,E und F gemessene PG E_2-Ausscheidung während linolsäurefreier (Tag 1-21) und linolsäurereicher (Tag 22-42) Formeldiät-Ernährung

Abb 6 Gemessene PGE_2-Ausschcidung im 24 Urin während Linolsäurereicher (Tag 1-21) und Linolsäurefreier (Tag 22-42) Formeldiäternährung der Versuchspersonen A B und C

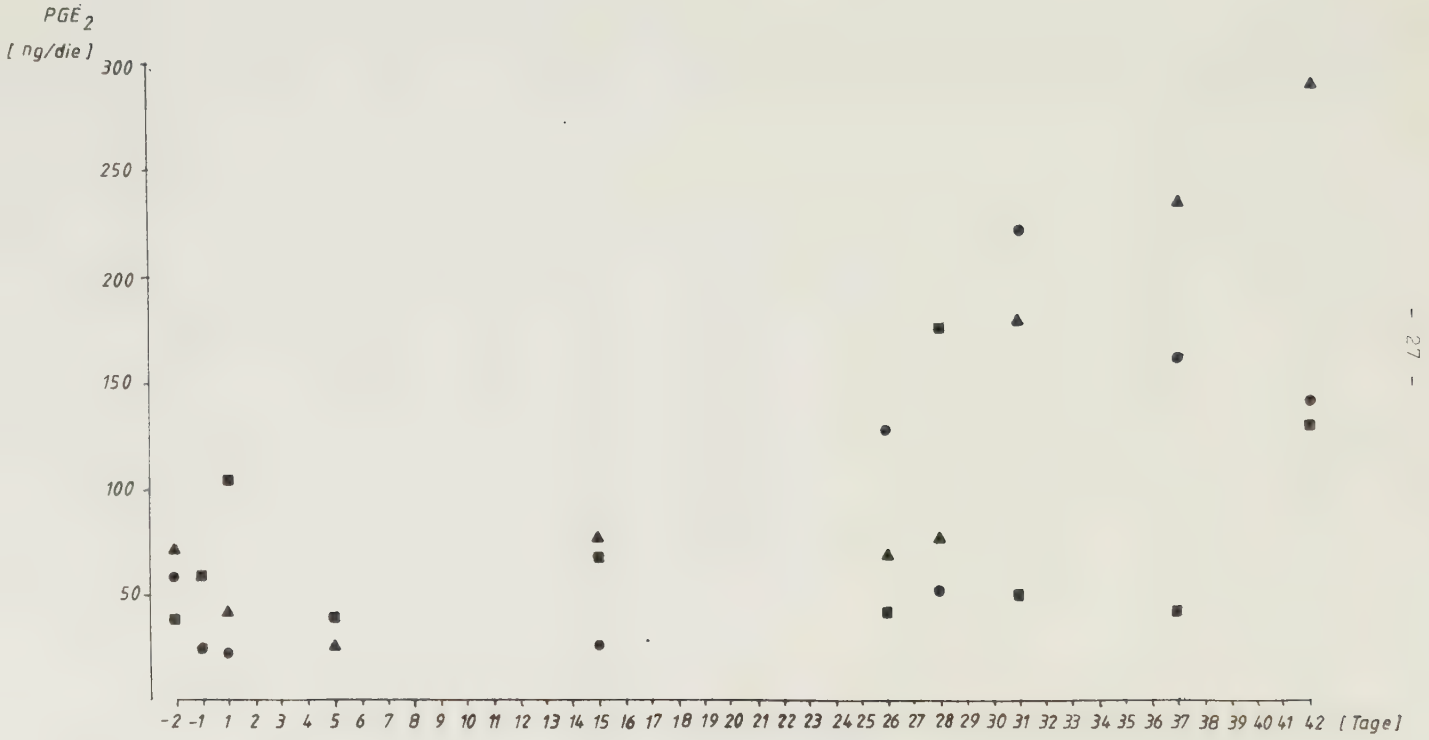


Abb 7 Gemessene PGE_2-Ausscheidung im 24 Std-Urin während linolsäurefreier (Tag 1-21) und linolsäurereicher (Tag 22-42) Formeldiäternährung der Verspersonen D E und F

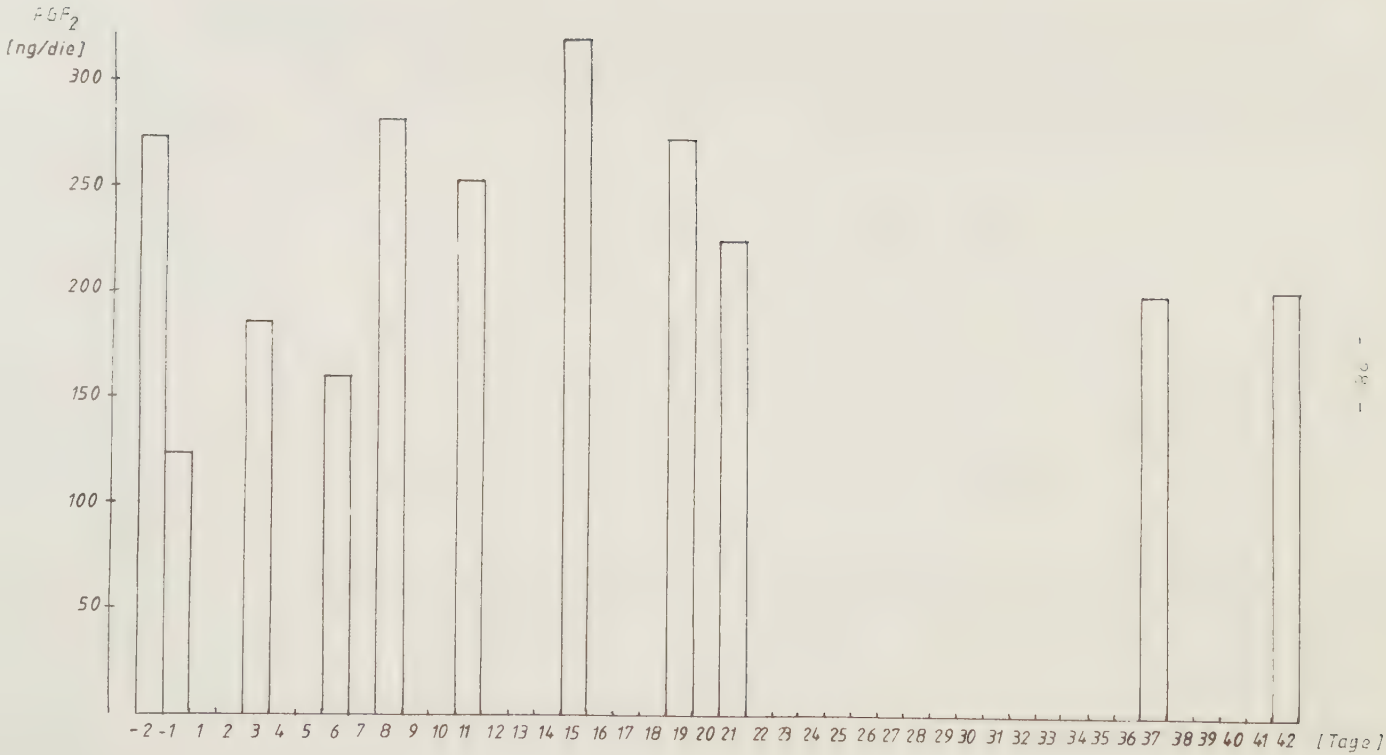


Abb 8 Durchschnittliche im 24 Std Urin der Versuchspersonen A,B und C gemessene $PG\ F_{2\alpha}$ Ausscheidung während linolsäurereicher(Tag 1-21) und linolsäurefreier(Tag 22-42) Formeldiät-Ernährung

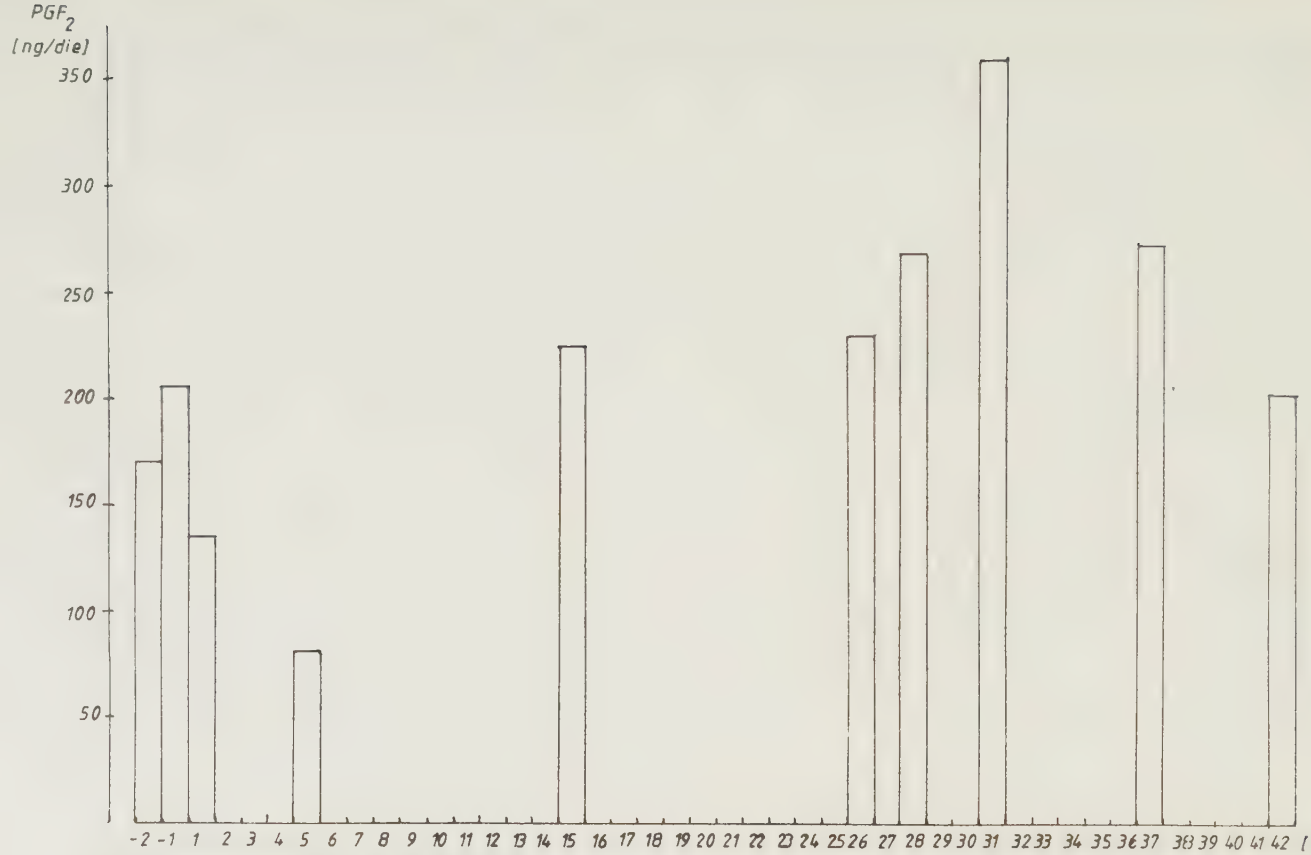


Abb 9 Durchschnittliche im 24 Std Urin der Versuchspersonen D, E und F gemessene PG $F_{2\alpha}$ Ausscheidung während linolsäurefreier (Tag 1-21) und linolsäurereicher (Tag 22-42) Formeldiät-Ernährung

Abb 10 Gemessene $PGF_{2\alpha}$-Ausscheidung im 24 Std-Urin während linolsäurereicher (Tag 1-21) und linolsäurefreier (Tag 22-42) Formeldiäternährung der Versuchspersonen A, B und C.

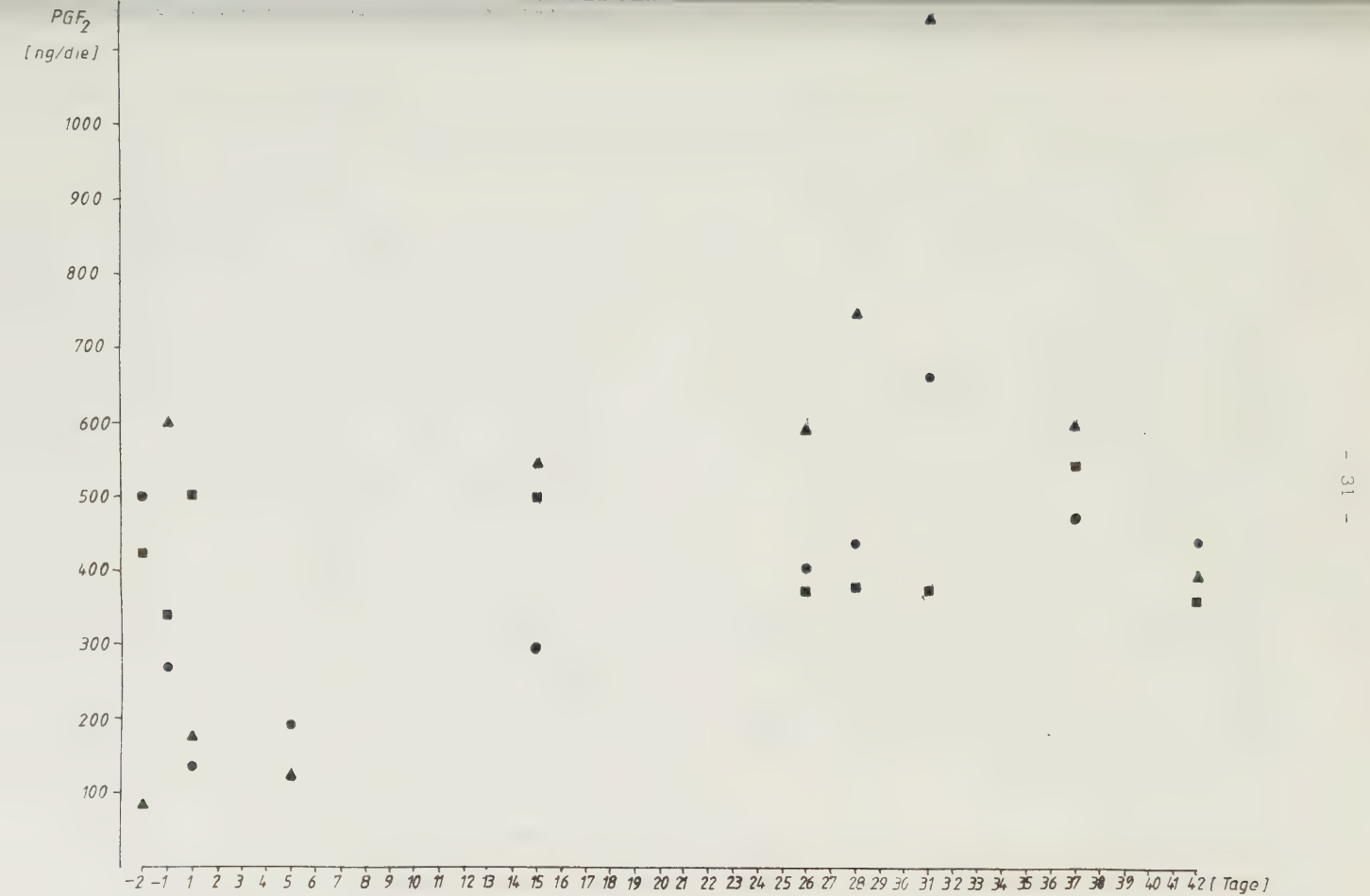


Abb 11 Gemessene PG $F_{2\alpha}$-Ausscheidung im 24 Std-Urin während linolsäurefreier (Tag 1-21) und linolsäurereicher (Tag 22-42) Formeldiäternährung der Versuchspersonen D E und F

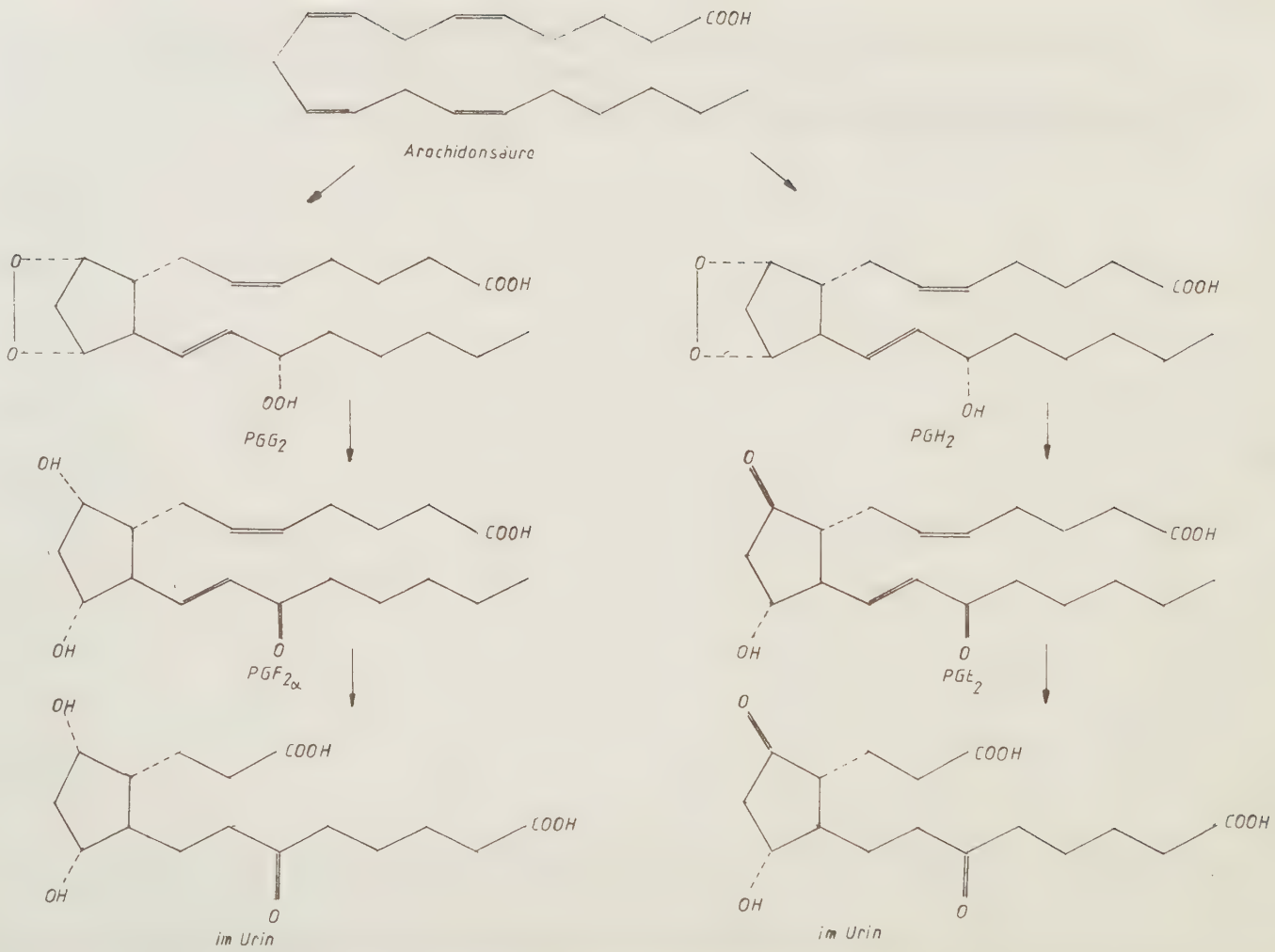


Abb 12 Metabolismus von Archidonsäure beim Menschen

Tabelle 1 : Zusammensetzung der Elutionslösungen. Die Mischungsverhältnisse sind in Volumenprozent angegeben.

	S1	S2	S3	S4
Ethylacetat	6o	6o	6o	6o
Benzol	4o	4o	4o	4o
Methanol	o	2o	1o	2

Tabelle 2: Zusammensetzung der Formeldiäten

Nährstoffquelle	(g)	Nährstoff	(g)	Kalorien	P	F	KH
				(% der Nahrungsenergie)			
Hyperprotidine FD 1	87	Protein (92 %)	8o	33o	15		
Malto Dextrin FD 1	483	Kohlen-hydrat (94,5 %)	456	187o			85
Hyperprotidine FD 2	87	Protein (92 %)	8o	33o	15		
Malto Dextrin FD 2	312	Kohlen-hydrat (94,5 %)	295	121o			55
Fett FD 2	71	Fett	71	66o		3o	
Summe				22oo	15	3o	55/85

Wasser	5oo
NaCl	5
KCl	3
Cholesterin FD 1	o,6

Tabelle 3 : Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuren (% der Gesamtfettsäuren) im Distelöl der Formeldiät 2. Angegeben ist die Kettenlänge (z.B. C 16) und die Anzahl der Doppelbindungen (z.B. : 1) in den Fettsäuren.

Kennzeichnung der Fettsäure	% der Gesamtfettsäuren
C 16 : 0	4,7
18 : 0	2,3
18 : 1	14,6
18 : 2	78,o
Summe	loo,o
p/s-Quotient	11,1

Tabelle 4 : Daten der Versuchspersonen A - F

	A	B	C	D	E	F
Alter (Jahre)	31	3o	32	22	29	28
Körpergröße (cm)	173	165	168	183	164	16o
Körpergewicht (kg)	58,o	56,o	51,2	58,2	55,o	47,o

Tabelle 5 : Zählrate in den einzelnen Fraktionen der säulenchromatographischen Elution von (5, 6, 8, 11, 12, 14, 15 (n)-^{3}H) PG E_2 nach Extraktion aus 2 ml Urin

Elutionslösung	<------S1------>					<----------S4---------->							<----S2---->		
(ml)	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	18	22	3	6	9
^{3}H-PG E (cpm)	66	286	3o6	15o	7o	4o	36	396	1681	1219	78o	43o	4o5	29o	23
	<------14 %----->					<----------74 %---------->							<---12 %--->		

Tabelle 6 : Zählraten in den einzelnen Fraktionen der säulenchromatographischen Elution von (5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15 (n)-^{3}H) PG $F_{2\alpha}$ nach Extraktion aus 2 ml Urin

Elutionslösung	<------S1----->					<----------S4--------->							<-----S2----->		
(ml)	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	18	22	3	6	9
^{3}H-PG $F_{2\alpha}$ (cpm)	22	48	44	36	31	23	23	96	133	89	68	68	682	1385	54
	<------6 %----->					<----------17 %---->							<------74 %---->		

Tabelle 7 : PG E-Ausscheidung (ng/die) im 24-Stunden-Urin der sechs Versuchspersonen (A - F) während des 42-tägigen Ernährungsversuchs

	A	B	C	D	E	F
-2	74	272	46	144	118	78
-1	61	117	65	-	49	119
1				88	41	2o1
2						
3	215	128	2o8			
4						
5				52	77	-
6	137	121	147			
7						
8	62	153	145			
9						
1o						
11	86	133	243			
12						
13						
14						
15	78	134	239	156	52	136
16						
17						
18						
19	146	226	144			
2o						
21	186	28o	317			
22						
23						
24						
25						
26				138	255	81
27						
28				153	1o4	352
29						
3o						
31				361	446	99
32						
33						
34						
35						
36						
37	1o1	138	114	471	325	83
38						
39						
4o						
41						
42	98	1oo	-	581	282	262

Tabelle 8 : PG $F_{2\alpha}$-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin (ng/die) der sechs Versuchspersonen (A - F) während des 42-tägigen Ernährungsversuchs

	A	B	C	D	E	F
-2	465	9o8	236	86	5oo	427
-1	22o	255	269	596	269	339
1				173	137	5o4
2						
3	323	373	419			
4						
5				131	191	-
6	215	223	528			
7						
8	447	633	622			
9						
1o						
11	486	415	616			
12						
13						
14						
15	4o3	1o5o	472	546	299	5o1
16						
17						
18						
19	285	874	473			
2o						
21	354	275	721			
22						
23						
24						
25						
26				596	414	377
27						
28				757	412	381
29						
3o						
31				1118	668	373
32						
33						
34						
35						
36						
37	259	3o5	624	6o6	474	547
38						
39						
4o						
41						
42	452	136	628	4o2	447	366

Tabelle 9 : Wertetabelle der durchschnittlichen im 24-Stunden-Urin der Versuchspersonen A, B und C gemessenen Ausscheidung von PG E bzw PG $F_{2\alpha}$ während linolsäurereicher (Tag 1 - 21) und linolsäurefreier (Tag 22 - 42) Formeldiät-Ernährung

Versuchstag	-2	-1	3	6	8	11	15	19	21	37	42
PG E_2 (ng/die)	131	81	184	135	12o	164	167	172	261	117	162
PG $F_{2\alpha}$ (ng/die)	545	248	371	322	567	5o6	642	544	45o	396	4o5

Tabelle 1o: Mittelwerte der bei den Versuchspersonen D, E und F gemessenen Ausscheidung von PG E bzw. PG $F_{2\alpha}$ im 24-Stunden-Urin während linolsäurefreier (Tag 1 - 21) und linolsäurereicher (Tag 22 -42) Formeldiät

Versuchstag	-2	-1	1	5	15	26	28	31	37	42
PG E_2 (ng/die)	113	84	114	65	114	158	2o3	3o2	293	375
PG $F_{2\alpha}$ (ng/die)	338	41o	271	161	448	462	527	72o	542	4o5

F. Literaturverzeichnis

1 Horton, R., Dunn M.: Prostaglandins and the Kidney, Mineral Electrolyte Metab. 6 : 5-9, 1981.

2 Änggard E.,Oliw E.: Formation and Metabolism of Prostaglandins in the Kidney. Kidney International 19: 771-78o, 1981.

3 Tan S.Y., Sweet P., Mulrow J.: Impaired renal Production of Prostaglandin E_2: A newly identified Lesion in Human Essential Hypertension. Prostaglandins 15: 139-147, 1978.

4 Granström E.: Chemistry of Prostaglandins and Thromboxanes. Prostaglandins and Thromboxanes 13: 1-8, 1977.

5 Adam O., Dill-Wiessner M., Wolfram G., Zöllner N.: Platelet Aggregation and Prostaglandin Turnover in Man during Linoleic Acid Supply with Formula Diets. Research in Experimental Medicine 177: 224-235, 198o.

6 Adam O., Wolfram G., Zöllner N.: Platelet Fatty Acids and Prostaglandin Turnover during Defined Linoleic Acid Intake with Formula Diets. Artery 8 (1): 85-89, 198o.

7 Scherer B., Shess W., Weber P.C.: Radioimmunological and Biological Measurement of Prostaglandins in the Rabbit Urine: Decreases of PG E_2 Excretion at high NaCl Intake. Prostaglandins 13: 1127, 1977.

8 Burch R.M., Knapp D.R., Halushka P.V.: Vasopressin Stimulates Thromboxane Synthesis in the Toad Urinary Bladder: Effects of Imidazole. J. Pharmacol. Exp. Therap. 21o: 344, 1979.

9 Oates J.A., Whorton R., Gerkens J.F.: The Participation of Prostaglandins in the Control of Renin Release. Fed. Prod.: 38-72, 1979.

1o Nugteren D.H., Van Evert W.C., Soeting W.J., Spuy H.J.: Effect of Different Amounts of Linoleic Acid in the Diet on the Excretion of Urinary Prostaglandin Metabolites in the Rat. Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 8: 1793-1796, 198o.

11 Lijnen P.J., Verschueren L.J., Fagard R.H., Amery A.K.: Urinary Prostaglandins E_2 and $F_{2\alpha}$ Excretion in Normal Subjects. Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie 88: 234-238, 198o.

12 Kibbey W.E., Broun D.G., Minton J.P.: Chromatographic Patterns of Prostaglandins Using Different Lots of Silicic Acid. Prostaglandins 13: 1023-1032, 1977

13 Jaffe B.M., Smith J.W., Newton B., Parker C.W.: Radioimmunoassay for Prostaglandins. Science 171: 494-499, 1971

14 Frölich J.C., Wilson T.W., Sweetman B.J., Smigel M., Nies A.S., Carr K., Watson J.T., Oates J.A.: Urinary Prostaglandins: Indentification and Origin. J. Clin. Invest. 55: 463-470, 1975

15 Van Doorp D.A.: Essential Fatty Acids and Prostaglandins. Acta Biol. Med. Ger. 35: 1041-1049, 1976

16 Weiss L.: Bedeutung der essentiellen Fettsäuren. In: Physiologische Chemie, Ed. Harper H.A., Petrides P.E., Weiss L.: 342-343, Berlin 1975

17 Van Doorp D.A., Buytenhek M., Christ-Hazelhof E., Nugteren H.D., Van der Ocderva F.J.: Isolation and Properties of Enzymes involved in Prostaglandin Biosynthesis. Acta Biol. Med. Ger. 37: 691-699, 1978

18 Morrison A.R.: Prostaglandins and the Kidney. Am. J. 69: 171-173, 1980

19 Hassid A., Konieczkowski M., Dunn M.J.: Prostaglandin Synthesis in isolated Rat Kidney Glomeruli. Proc. Nat. Acad. Sci. 76: 1155-1159, 1979

20 Murihead E.E., Germain G., Leach B.E.: Production of Renomedullary Prostaglandins by Renomedullary Interstitial Cells Grown in Tissue Culture. Circ. Res. 30: 161-167, 1972

21 Samuelsson B., Granström E ., Green K., Hamberg M., Hammerström S.: Prostaglandins and Thromboxanes. Ann. Rev. Biochem. 47: 997-1029, 1978

22 Morris H.G., Sherman N.A., Shepperdson F.T.: Variables Assosciated with Radioimmunoassay of Prostaglandins in Plasma. Prostaglandins 21: 771-778, 1981

Danksagung

Den Herren Prof. Dr. G. Wolfram und Prof. Dr. N. Zöllner möchte ich für die wohlwollende Überlassung des Themas danken. Herrn Priv. Doz. Dr. O. Adam danke ich herzlich für die Betreuung bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

2.3.1958	Geburt in München Vater: Josef Grundl, Gymnasialprofessor i.R. Mutter: Dr.med. Angela Grundl, geb. Hatzelmann
1964 - 68	Besuch der Volksschule
1968 - 77	Besuch des Gymnasiums, 1977 Abitur
Nov. 1977	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Nov. 1983	Ablegung der Ärztlichen Prüfung